13-02

KOD SYBR®
qPCR Mix

(Code No. QKD-201, QKD-201T)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A4842K

－ 目 次 －

[1] はじめに ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
[2] 製品内容・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2
[3] 製品のほかに用意するもの・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3
[4] 使用方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6
[5] 使用例(Ⅰ) 長鎖/GC リッチなターゲットの定量・・・・・13
[6] 使用例(Ⅱ) 融解曲線による増幅長多型解析・・・・・・15
[7] 使用例(Ⅲ) ASP-PCR による SNP 解析・・・・・・・・・ 18
[8] 関連プロトコル：RNA サンプルからの cDNA 合成・・ 20
[9] トラブルシューティング・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 21
[10] 関連商品・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 25

ご注意

本キットに含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。本キットの使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

※SYBR®は、Molecular Probes Inc.の登録商標です。

[1] はじめに

KOD SYBR® qPCR Mix は、SYBR® Green I 検出系によるリアルタイム PCR 用 2×濃度のマスターミックス試薬です。本試薬は、ROX(別添)とプライマー以外の成分があらかじめ混合されています。そのため、反応液調製を簡便化できるとともに、サンプル間の蛍光強度のばらつきを最小限に抑えられ、再現性の高い結果を得ることができます。

本製品は、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性（校正活性）を除去した KOD exo(-) DNA polymerase と最適化されたバッファー組成を組み合わせることで、KOD の優れた合成能やクルード成分の阻害を受けにくいという性質を SYBR® Green I を用いるインターカレーションアッセイにおいて最大限に発揮させることを可能としました。

◆本製品の特長◆

1. 長鎖ターゲット（～2kb）に対応

従来のリアルタイム PCR 試薬では増幅困難であった 500bp~2kb のターゲットに対して定量的な増幅が認められます。そのため、KOD FX シリーズや KOD -Plus-シリーズなどの通常の PCR 用として設計したプライマーをそのまま使用することができます。また、2kb までのターゲットを増幅することが可能であるため、プライマーの選択幅を格段に広げることができます。さらに、様々なターゲット長を選択できるため、Tm 値の異なる増幅産物の設計が容易であり、幅広い融解曲線解析が可能です。この性質を利用し、エンドポイントアッセイを用いる多型解析において、力を発揮します。

2. クルードサンプルを用いるエンドポイント解析に対応

クルードサンプル（右表）を用いて、増幅が可能です。そのため、ライセートを直接用いるジェノタイピングなどの用途に最適です。

クルードサンプル例

血液	終濃度 1.0%程度
爪	1mm 程度
髪	毛根から 1～2cm
口腔粘膜	水懸濁液
培養細胞	～10^3 細胞
動物組織	アルカリ熱抽出液
植物組織	ライセート（終濃度 1%以下）

3. GC 含有率が高いターゲットに有効

KOD DNA polymerase を使用することで、従来品では困難であった GC 含有率が 70%を超えるようなターゲットにおいても、定量的な増幅が認められます。

4. 高い特異性

組成最適化により、PCR の特異性が向上しました。プライマーダイマーなどの非特異反応を抑えることで、低コピーまでの幅広い定量可能域を得ることができます。

5. 様々な機器に対応

一般的なブロックタイプの機器（Fast Mode にも対応）のほか、ガラスキャピラリーを用いる高速サイクラーにも対応しています。また、50×ROX reference dye が別添付されているため、パッシブリファレンスを必要とする機器（Applied Biosystems 社製機器など）においても、各機器に適した ROX 濃度でご使用頂けます。

[2] 製品内容

本製品には、以下の試薬が含まれています。

品名および内容	保存	容量 (QKD-201)	容量 (QKD-201T)
KOD SYBR® qPCR Mix	-20°C (または 2～8°C で 3 ヶ月以内) 遮光保存	5ml (1.67ml × 3)	1ml (1ml × 1)
50 × ROX reference dye	-20°C (または 2～8°C) 遮光保存	250µl	50µl

KOD SYBR® qPCR Mix

- 反応バッファー、SYBR® Green I、dNTPs、Mg^{2+}、KOD exo(-) DNA polymerase 及び、抗 DNA ポリメラーゼ抗体などを含む 2 × 濃度のプレミックス溶液です。鋳型 DNA (cDNA、genomic DNA、plasmid DNA など)とプライマー溶液を添加し、滅菌水で 1 × 濃度に調製して使用してください。
- ROX (passive reference dye)は含まれておりません。
- 製品到着後は、-20°C で保存してください。
- 初回使用時は、融解させた後、ゆるやかに転倒混和し、溶液を完全に均質化した上でご使用ください。その後は、3 ヶ月以内を目安として、2～8°C で冷蔵保存することができます。
- 長期間使用しない場合は、-20°C で再度保存してください。10 回程度の凍結融解の繰り返しは、品質に影響がないことを確認しています。
- SYBR® Green I の蛍光減衰を防ぐため、保存の際は遮光してください。

50 × ROX reference dye

- Applied Biosystems 社製機器、Agilent Technologies 社製機器など、ウェル間の蛍光強度および分注誤差補正のため、パッシブリファレンスを用いる機器での反応の際に添加してください。最適な添加量は機種により異なります。主な機器の添加量については、**[4] 使用方法 (1) 反応液の調製**の項目をご覧ください。
- パッシブリファレンスによる補正を行わない機器では添加する必要はありません。
- -20°C または 2～8°C で遮光保存してください。
- 長期間使用しない場合は、-20°C で凍結保存してください。

※ROX reference dye を同一濃度で定常的にご使用される場合、50 × ROX reference dye をあらかじめ KOD SYBR® qPCR Mix へ混合して保存することもできます。混合後はゆるやかに転倒混和し、上記の KOD SYBR® qPCR Mix の保存条件に従って保存してください。混合比率は以下の通りです。ROX 濃度については、**[4] 使用方法 (1) 反応液の調製**の項目をご覧ください。

ROX を 1 × 濃度で使用する場合

qPCR Mix : 50 × ROX = 1.67ml : 66.8µl (QKD-201) 又は 1ml : 40µl (QKD-201T)

ROX を 0.1 × 濃度で使用する場合

qPCR Mix : 50 × ROX = 1.67ml : 6.7µl (QKD-201) 又は 1ml : 4µl (QKD-201T)

[3] 製品のほかに用意するもの

本製品の他に、以下の試薬・機器類をご用意ください。

(1) リアルタイム PCR 装置

本製品は、一般的なブロックタイプ、高速タイプ、ガラスキャピラリータイプなど、各種リアルタイム PCR 装置にご使用いただけます。ご使用にあたっては各装置の取扱説明書に従ってください。

(2) プライマー

目的遺伝子配列に対応したプライマーセットをご用意ください。SYBR® Green Iを用いたインターカレーションアッセイでは特異性が重要となりますが、KOD -Plus-シリーズやKOD FXシリーズ、KOD Dash等を用いる一般的なPCRにおいて設計した、増幅長が2kbまでの特異性の高いプライマーは、基本的にはそのまま使用可能です。

新たにプライマーを設計する場合は、以下の注意事項を参考に設計してください。

- 増幅長が2kb以下になるように設計してください。
- プライマーの融解温度(melting temperature: Tm*[1])は、60～70°C程度に設定してください。ただし、融解温度は、計算方法により値が異なりますので、あくまで目安としてお考えください。
- GC含有率が45～60%となるように設計してください。
- プライマーダイマーの形成が起こらないように注意して設計してください。
  ①Forward、Reverseのプライマーの3'末端が相補的なもの
  ②プライマーの3'末端付近のGC含有率が高いもの
  ③プライマー内に相補的な配列を含むもの
  は、プライマーダイマーが発生しやすくなるため、避けてください。
- 3'末端をG又は、Cで設計することでプライミング効率を高めることができます。ただし、3'端領域にGCが偏りすぎると非特異反応が発生しやすくなるので注意してください。
- cDNAをターゲットとする場合は、可能であればイントロンをはさんだ領域に増幅領域を設定します。これにより、ゲノムDNA由来の増幅を防ぐことができます。

また、プライマーの精製純度は反応特異性に大きな影響を与えます。一般的に精製純度が低いプライマーでは品質のばらつきが大きくなり、非特異反応が発生しやすくなることがあります。可能であればHPLC精製、少なくともカートリッジ(OPC)精製以上の精製グレードのプライマーをご使用ください。

*1:プライマーのTm値の計算には、最近接塩基対法（Nearest Neighbor method）をお使いください。本取扱説明書記載のプライマーのTm値は、50mM Na^+濃度と0.5μMオリゴヌクレオチド濃度で計算した値を利用しております。弊社では、最近接塩基対法（Nearest Neighbor method）に基づくTm値計算プログラムを公開しています。弊社ライフサイエンス事業部のウェブページ(http://www.toyobo.co.jp/bio) からダウンロードしてご利用いただけます。

(3) 鋳型 DNA

本製品では、鋳型 DNA として、cDNA、genomic DNA、plasmid DNA、virus DNA などの各種 DNA、及び一部のクルードサンプルを用いることができます。

ただし、ウラシルを含む鋳型は使用できません。

(a) cDNA

・一般的な逆転写反応用試薬などを用いて合成した cDNA 液を、精製せずに滅菌水などで適宜希釈して、そのままリアルタイム PCR 反応液に添加してご使用いただくことができます。

・添加量は反応液量の 10%*1 を上限の目安としてください。高濃度の添加は、PCR 反応バッファーの組成を大きく変化させ、定量性低下の原因となります。

・弊社リアルタイム PCR 用逆転写キット ReverTra Ace® qPCR RT Kit (Code: FSQ-101)、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix(Code : FSQ-201)、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(Code : FSQ-301)は、リアルタイム PCR での反応阻害を低減させる組成を採用しており、反応液量の 20%まで添加が可能です。

*1: リアルタイム PCR での使用が考慮されていない一部の逆転写反応用試薬では、添加可能量が 10%よりも少なくなる場合があります。

(b) genomic DNA、virus DNA

・genomic DNA、virus DNA を鋳型として使用することができます。

・添加量は、50µl 反応あたり 200ng*2 を上限の目安としてください。

*2: SYBR® Green I は全ての 2 本鎖 DNA に結合し蛍光を放つ性質を持つため、多量の 2 本鎖 DNA を鋳型として使用した場合、鋳型 DNA にも SYBR® Green I が結合し、ベースラインが大きく上昇することがあります。このため genomic DNA を鋳型として使用する場合、高濃度域における直線性が低下する場合があります。

(c) plasmid DNA

・plasmid DNA を鋳型として使用することができます。

・環状のまま使用すると、増幅効率が低下し、正しいコピー数*3 が反映されない場合がありますので、制限酵素で切断し、直鎖状にしたものをご使用ください。

・精製された plasmid DNA 溶液を希釈する際は、溶液中の DNA 濃度が極めて低くなることで、DNA が容器への吸着などによって失われやすくなります。そのため、リアルタイム PCR における、低濃度域での直線性や再現性が大きく低下する原因となります。希釈の際には、反応と関与しない核酸(yeast RNA など)をキャリアとして希釈液に混合することで、低濃度域の直線性が改善される場合があります。

*3: plasmid DNA のコピー数は、以下の式で簡易的に算出することができます。

1µg あたりの plasmid DNA のコピー数 = 9.1×10^{11} / plasmid DNA のサイズ(kb)

(d) クルードサンプル

PCR 反応液に生体組織などのクルードサンプルを添加する場合は、以下の添加量を参照してください。高濃度の添加は、反応性低下の原因になりますのでご注意ください。

●エンドポイント検出において増幅可能な添加量（20µl 反応の場合）

全血	1/10 に希釈し、2µl 添加
爪	米粒 1/3 程度を直接添加
髪	毛根から 1~2cm を直接添加
口腔粘膜	綿棒などで採取後、200µl の水で懸濁、反応液に 5µl 添加
培養細胞	~10^3 cells
動物組織	アルカリ熱抽出液*[1]
植物組織	ワンステップ法による植物ライセート*[2]

*1: アルカリ熱抽出液は、下記の方法にて調製します。

<u>生体試料（添加量は、右図を参照ください）</u>

↓ ←50mM NaOH　180µl 添加
↓ Vortex にて良く攪拌
↓ 95°C、10 分インキュベート
↓ ←1M Tris-HCl(pH8.0)　20µl で中和
↓ Vortex にて良く攪拌
↓ 遠心　12,000rpm、5 分（optional）

20µl 反応系に上清 0.5µl～2µl を添加
（生体試料は、完全には溶解しません）

生体試料の例	
マウステール	3mm　程度
豚肉	20mg 程度
牛肉	20mg 程度
爪	5mg　程度

*2: 植物ライセートは、下記の方法（ワンステップ法）にて調製します。

<u>植物（イネ、タバコ葉、米粒など）（3mm 角）</u>

↓ ←Buffer A　100µl 添加
↓ Vortex にて良く攪拌
↓ 95°C、10 分インキュベート
↓ Vortex にて良く攪拌

上清を滅菌水で 1/10 希釈

↓

20µl 反応系に上清 0.5µl～2µl を添加

Buffer A
100mM Tris-HCl (pH9.5)
1M KCl
10mM EDTA

Buffer A 中でペッスルを用いて植物組織をホモジナイズすることで、効率を向上させることができる場合があります。その際は、加熱は不要です。

[4] 使用方法

(1) 反応液の調製

以下に、50 µl および 20 µl 反応時の調製例を示します。使用するリアルタイム PCR 機器の特性に合わせ、適宜反応液量を増減させてください。

試薬	50µl 反応	20µl 反応	最終濃度
滅菌水	X µl	X µl	
KOD SYBR® qPCR Mix	25 µl	10 µl	1×
Forward Primer	10 pmol	4 pmol	0.2 µM*1
Reverse Primer	10 pmol	4 pmol	0.2 µM*1
50×ROX reference dye	1 / 0.1 µl	0.4 / 0.04µl	1× / 0.1×*2
DNA 溶液	Y µl	Y µl	
合計液量	50 µl	20 µl	

*1: 増幅効率が不十分な場合は、プライマー濃度を増やすことで、また非特異反応が発生する場合は、プライマー濃度を減らすことで、反応結果が改善することがあります。プライマー濃度は、最終濃度 0.05～1.0 µM を目安にご検討ください。

*2: Applied Biosystems 社製機器、Agilent Technologies 社製機器などでは、ウェル間の蛍光強度および分注誤差補正のためにパッシブリファレンスを用います。これらの機器での反応の際に ROX reference dye を添加してください。最適な添加量は機種により異なります。主な機器の添加量は以下の通りです。また、補正を行わない機器では添加する必要はありません。

表 1: 主な機器の最適な ROX reference dye 濃度

機器	最終濃度 (添加量)
Applied Biosystems 7000、7300、7700、7900HT、StepOne™、StepOnePlus™ など	1× (1/50 量)
Applied Biosystems 7500、7500Fast、Agilent Technologies 社製機器(オプション)など	0.1× (1/500 量)
Roche 社製機器、Bio-Rad 社製機器、BioFlux LineGene など	不要

また、ROX reference dye を同一濃度で定常的にご使用される場合、50×ROX reference dye をあらかじめ、下記の混合比率で KOD SYBR® qPCR Mix へ混合して保存することもできます。

ROX を 1×濃度で使用する場合

qPCR Mix : 50×ROX = 1.67ml : 66.8µl (QKD-201) 又は 1ml : 40µl (QKD-201T)

ROX を 0.1×濃度で使用する場合

qPCR Mix : 50×ROX = 1.67ml : 6.7µl (QKD-201) 又は 1ml : 4µl (QKD-201T)

(2)PCR サイクル条件設定

(a)推奨 PCR サイクル条件

まず、下記の推奨条件で PCR を行うことをお勧めします。反応特異性が低い場合、増幅効率が低い場合は、「(b)PCR サイクル条件検討方法」に記載の方法で条件の検討を行ってください。

ステップ		温度	時間	昇降速度
初期変性		98°C	2 分*1	最大
PCR (40 cycles*4)	変性	98°C	10 秒	最大
	アニーリング	60°C*2	10 秒	最大
	伸長	68°C	30 秒 / 500bp*3 (500bp 以下は 30 秒)	最大
		(Data Collection は伸長ステップに設定します)		
融解曲線解析 (Melting / Dissociation Curve Analysis)*5				

*1: 本製品では抗体を用いるホットスタートシステムを採用しているため、98°C、2 分の初期変性を行い、抗体を熱変性させてください。

*2: 十分な増幅効率が得られない場合は、アニーリング温度を低め（～50°C）に、非特異反応が生じる場合はアニーリング温度を高め（～68°C）に設定することで、反応が改善されることがあります。

*3: 伸長時間は、標的配列が 500bp 以下の場合は 30 秒で十分に反応が進行しますが、一部の機器では、安定した蛍光測定に 30 秒より長い時間を必要とする場合があります。増幅曲線のがたつきや、ウェル間の変動が大きい場合には、長めの時間(45～60 秒)を設定してください。また、機器や制御用ソフトウェアの仕様上、30 秒に設定できない場合もありますので、取扱説明書をご確認の上、設定可能な時間を適宜設定してください。また、標的配列が 500bp 以上の場合は、伸長時間を、ターゲット鎖長 500bp あたり 30 秒で設定してください。

*4: クルードサンプルからの検出の場合、立ち上がり（Ct値）が大きく低下する場合があります。この場合は、特異性が低下しない範囲でサイクル数（～50 cycles）を増やすことで、検出感度が改善されることがあります。

*5: SYBR® Green I 検出系では、DNA の増幅を SYBR® Green I の増幅産物への結合による蛍光強度の増大を指標として、検出を行います。通常の PCR と同様な反応のため簡便ですが、プライマーダイマーや目的以外の増幅産物も検出してしまうため、増幅を行った後に融解曲線解析による確認が必要です。融解曲線解析の設定は、各機器の標準設定に従ってください。詳しくは、各機器の取扱説明書をご覧ください。
GC 含有率が 80%を超えるターゲットについては、機器によって、融解曲線が途中で切れてしまう場合があります。この場合は、電気泳動により特異性を確認してください。融解温度の上限を 99°C に設定することで解決する場合もあります。

(b)PCR サイクル条件検討方法

反応特異性が低い場合、増幅効率が低い場合（増幅が確認できない場合）は、下記に示す方法で PCR サイクル条件の最適化を行ってください。

●反応特異性が低い場合

アニーリング温度を上げる、または 2 step PCR にすることで、反応特異性が改善することがあります。この場合、増幅効率とのバランスを確認しながら、最適なアニーリング温度を決定してください。

推奨条件

98°C、10 秒 → 60°C、10 秒 → 68°C、30 秒/500bp（40 cycles）

↓

アニーリング温度を上げる*1

98°C、10 秒 → ～68°C、10 秒 → 68°C、30 秒/500bp（40 cycles）

↓

2 step PCR にする

98°C、10 秒 → 68°C、30 秒/500bp（40 cycles）

●増幅効率が低い場合（増幅が確認できない場合）

伸長時間の延長、アニーリング温度を下げることにより増幅効率が改善することがあります。また、プライマー量を増やすことで増幅効率が改善する場合があります。

推奨条件

98°C、10 秒 → 60°C、10 秒 → 68°C、30 秒/500bp（40 cycles）

↓

伸長時間を延長する

98°C、10 秒 → 60°C、10 秒 → 68°C、～1 分/500bp（40 cycles）

↓

アニーリング温度を下げる*1

98°C、10 秒 → 50°C～、10 秒 → 68°C、30 秒/500bp（40 cycles）

*1: アニーリング温度の検討には、ABI StepOnePlus™の VeriFlex™ 機能や、Bio-Rad 社製機器の温度グラジェント（温度勾配）機能などを使用することで、一度の運転で複数のアニーリング温度の検討が可能であり、より簡便に検討を行うことできます。

(3)-1　Applied Biosystems StepOnePlus™ におけるサイクル条件設定例
(通常ブロックタイプ、ソフトウェアバージョン 2.2.2)

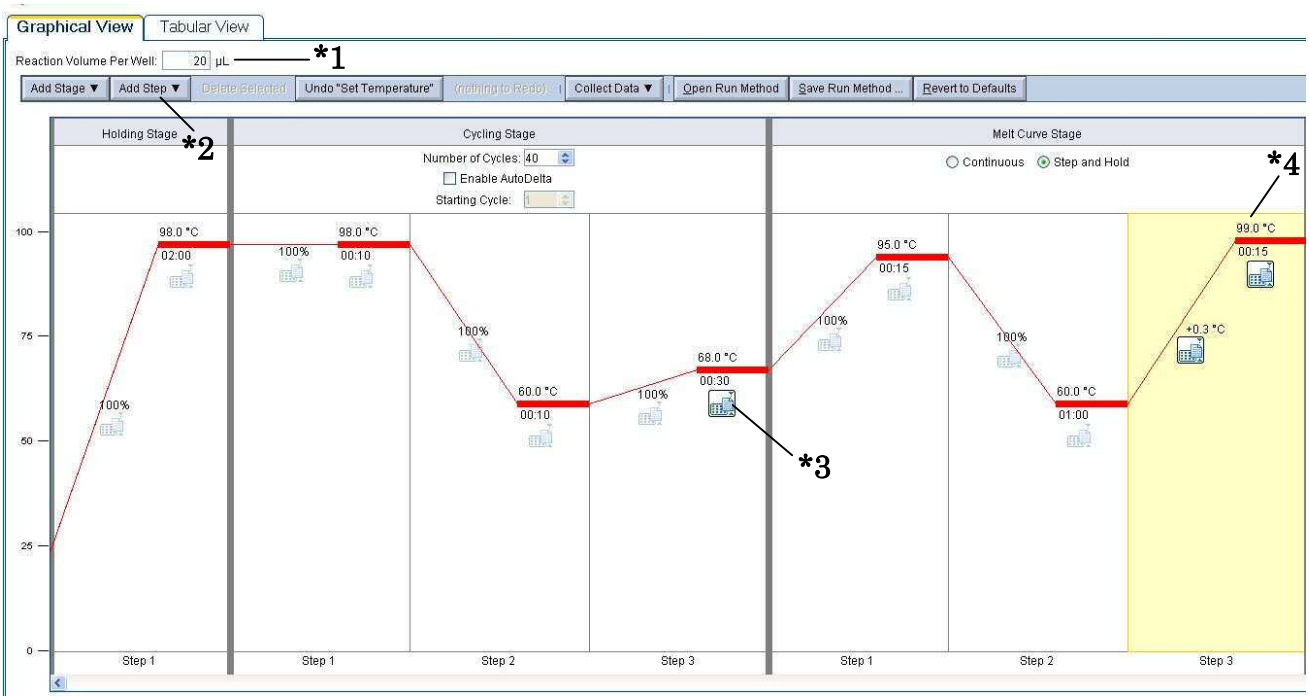
以下に、本試薬を Applied Biosystems StepOnePlus™ において用いる場合のサイクル条件設定例を示します。

1. ソフトウェアを起動し、Design Wizard、Advanced Setup、QuickStart のいずれかを選択します。

2. 下表のタブを選択し、reagents で SYBR® Green Reagents を選択します。

Design Wizard 場合	Methods＆Materials
Advance Setup の場合	Setup → Experiment Properties
QuickStart の場合	Experiment Properties

3. Run Methods を選択し、以下のように温度条件を設定します。



*1: Sample Volume (µL)の欄は、必ず正しい反応液量を入力してください。
*2: 初期設定では、2 step となっていますので、Add Step を選択し、3 step に変更してください。
*3: 伸長反応時にデータ回収ポイントを設定してください。
*4: 融解曲線作成用のサイクルを付加してください。GC 含有率が高い場合は、融解温度の上限を 99°C に設定してください。

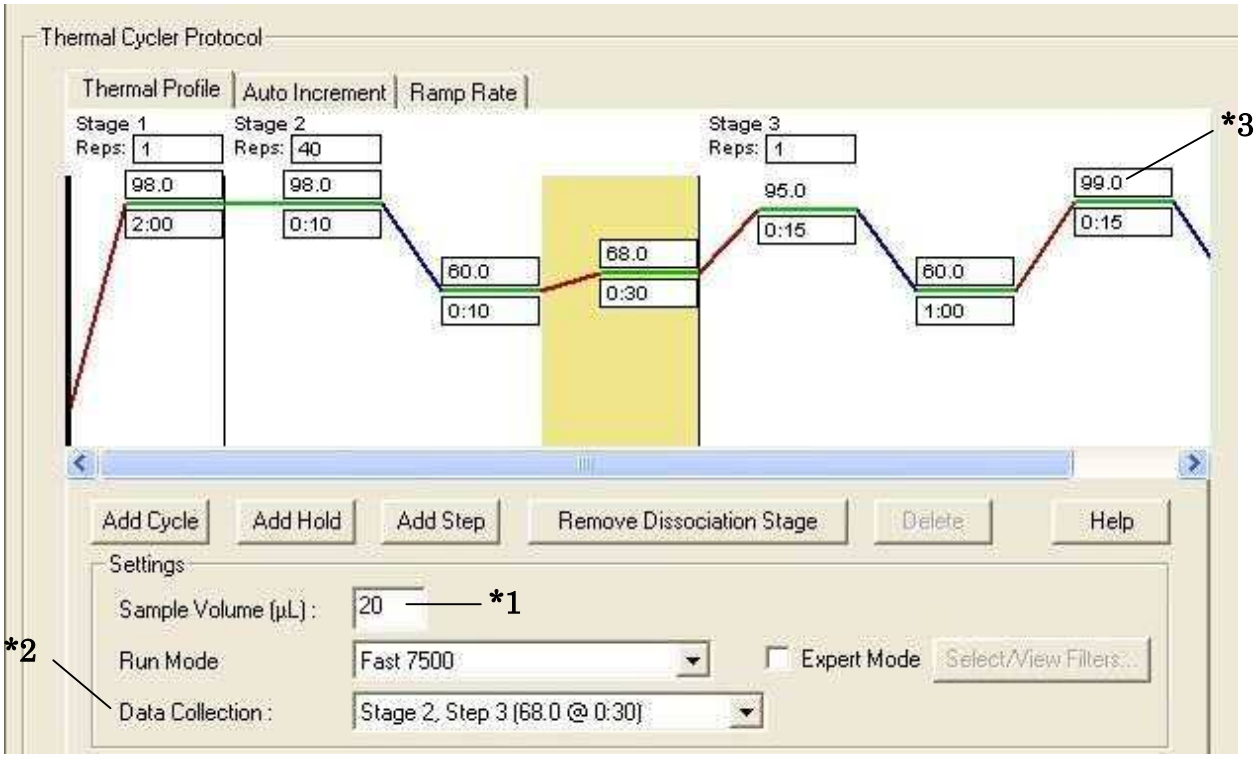
4. プレート、またはチューブをセットし、プログラムをスタートします。

(3)-2　Applied Biosystems 7500 Fast Real Time System における
サイクル条件設定例 (通常ブロックタイプ、ソフトウェアバージョン 1.4)

以下に、本試薬を Applied Biosystems 7500 Fast Real Time System において用いる場合のサイクル条件設定例を示します。

1. ソフトウェアを起動し、Instrument のタブを選択します。

2. 以下のように温度条件を設定します。



*1: Sample Volume (µL)の欄は、必ず正しい反応液量を入力してください。
*2: 伸長反応時にデータ回収ポイントを設定してください。
*3: 融解曲線作成用のサイクルを付加してください。GC 含有率が高い場合は、融解温度の上限を 99°C に設定してください。GC 含有率が 80%を超えるターゲットについては、融解曲線が途中で切れてしまう場合があります。

3. プレート、またはチューブをセットし、プログラムをスタートします。

(3)-3 Roche LightCycler® Nano におけるサイクル条件設定例
(ソフトウェアバージョン 1.0)

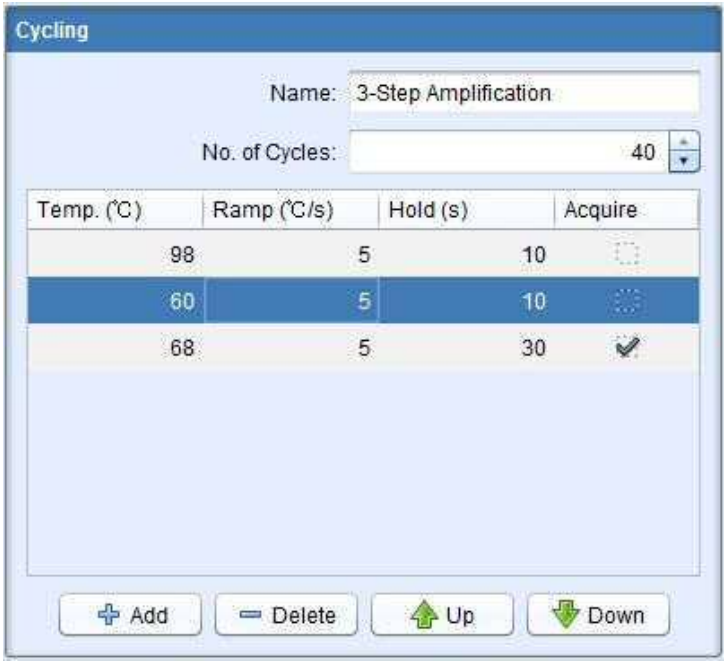
以下に、本試薬を Roche LightCycler® Nano において用いる場合のサイクル条件設定例を示します。

1. ソフトウェアを起動し、New ボタンを選択します。

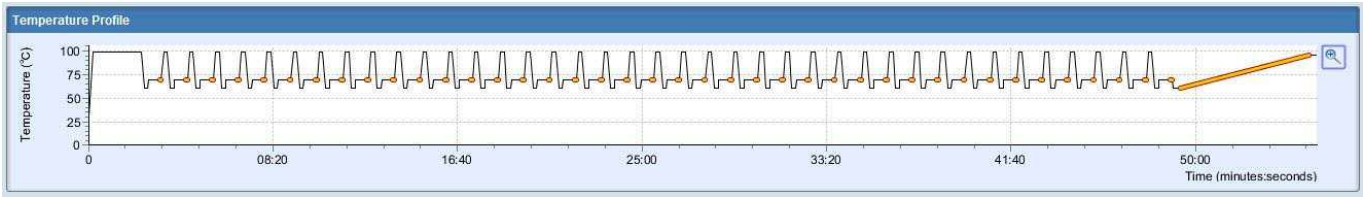
2. Experiment のタブを開き、Name に実験名を記載します。

3. Run Settings のタブを開き、Intercalating Dyes を選択します。

4. Profile のタブを開き、以下のように温度条件を設定します。
   1) Program の add ボタンを押し、Hold を選択します。
   2) 温度条件を、98°C、120 秒、5°C /秒に変更します。
   3) Program の add ボタンを押し、3-Step Amplification を選択します。
   4) 温度条件を下記のように設定します。
   5) 伸長反応時に Acquire のチェックがあることを確認します。



   6) Program の add ボタンを押し、Melting を選択します。
   7) 下記のようにプログラムが設定されていることを確認します。



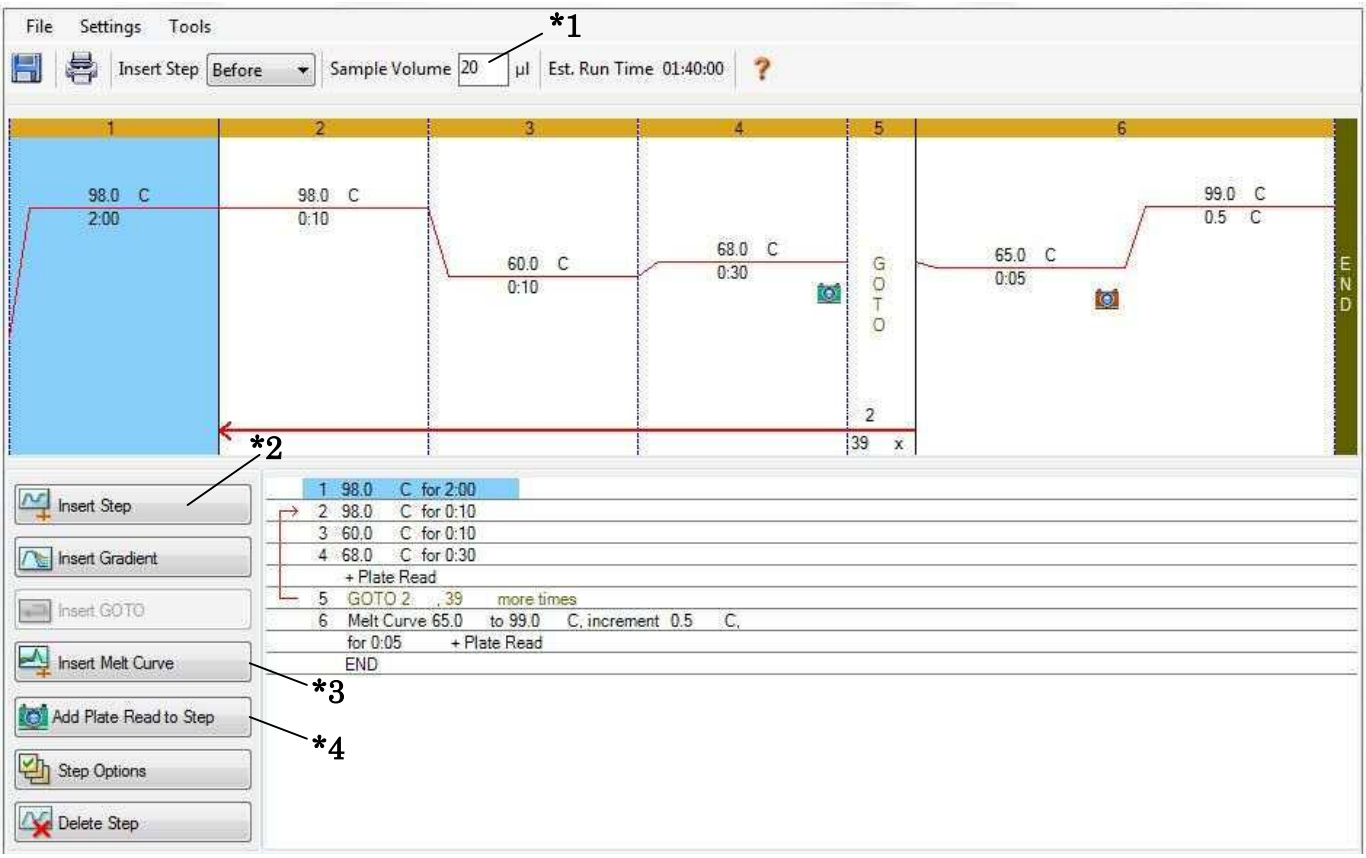
5. チューブをセットし、プログラムをスタートします。

(3)-4 Bio-Rad MiniOpticon におけるサイクル条件設定例
(ソフトウェアバージョン 2.0)

以下に、本試薬を Bio-Rad MiniOpticon において用いる場合のサイクル条件設定例を示します。

1. ソフトウェアを起動し、Create a new run を選択します。

2. Create New…を選択し、以下のように温度条件を設定します。



*1: Sample Volume (µl)の欄は、必ず正しい反応液量を入力してください。
*2: 初期設定では、2 step となっていますので、Insert Step を選択し、3 step に変更してください。
*3: Insert Melt Curve を選択し、融解曲線作成用のサイクルを追加してください。GC 含有率が高い場合は、融解温度の上限を 99°C に設定してください。
*4: 伸長反応サイクルに Add Plate Read to Step を選択し、データ回収ポイントを設定してください。

3. プレート、またはチューブをセットし、プログラムをスタートします。

[5] 使用例（Ⅰ） 長鎖 / GC リッチなターゲットの定量

実験例1：長鎖ターゲット

【方法】

KOD FX シリーズや KOD -Plus- シリーズなどの通常の PCR 用に設計したプライマーをそのまま用いて、TGF β の長鎖ターゲット（1.9kb）に対し、従来品と反応性の比較を行いました。鋳型には、Human genomic DNA (gDNA)を使用し、gDNA の 10 倍希釈（5 段階）と no-template control(NTC)について、反応を実施しました。

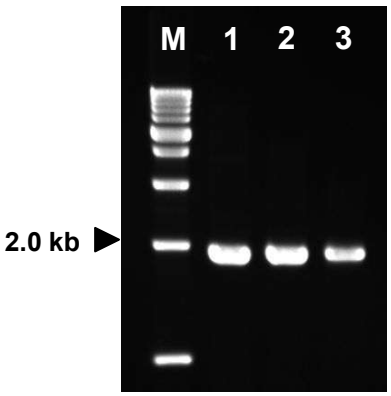
PCR サイクル条件：98°C,2 分 → 98°C,10 秒 / 60°C,10 秒 / 68°C,120 秒 (40 cycles)
※伸長時間は、30 秒 / 500bp で設定

使用機器： ABI StepOnePlus™

【結果】

Taq DNA polymerase を使用した弊社品（THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix）では増幅・定量が困難であった 1.9kb の長鎖ターゲットにおいても、本製品は、定量的な増幅が認められました。

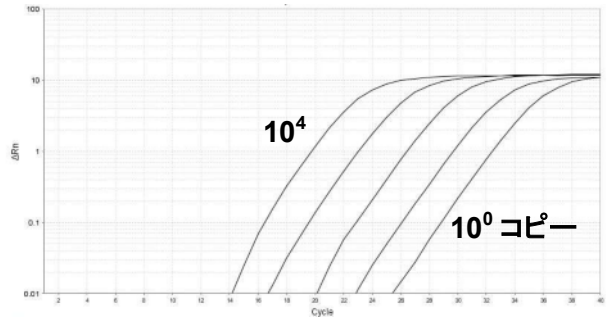
電気泳動解析



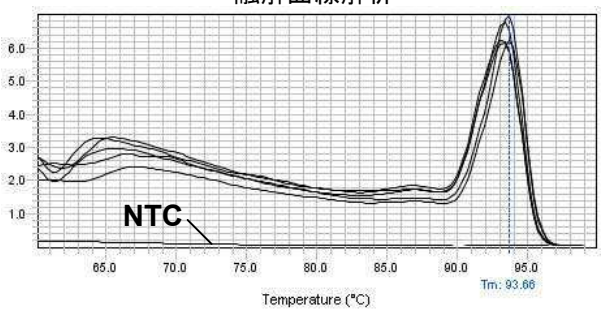
M : 1kb DNA Ladder
1 : KOD FX Neo
2 : KOD FX
3 : KOD -Plus- Ver.2

KOD SYBR® qPCR Mix

増幅曲線解析

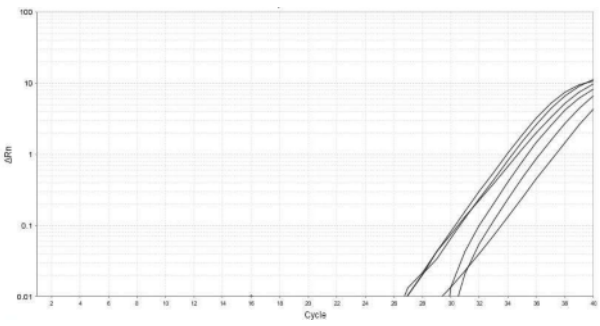


融解曲線解析

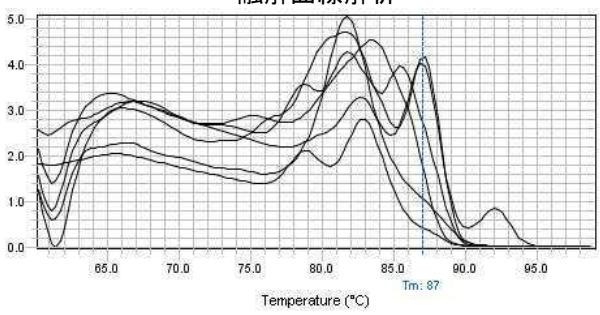


弊社品
THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix

増幅曲線解析



融解曲線解析



実験例 2：GC リッチなターゲット

【方法】

GC 含有率が 70%を超えるようなターゲットに対し、各リアルタイム PCR 試薬による反応性の比較を行いました。鋳型には、弊社の高性能逆転写反応用試薬「ReverTra Ace® qPCR RT Kit (Code: FSQ-101)」により合成した HeLa 細胞 total RNA 由来の cDNA を用い、cDNA の 5 倍希釈（5 段階）について、反応を実施しました。PCR サイクル条件は、各試薬の推奨条件を使用しています。

本製品の PCR サイクル条件： 98°C,2 分 → 98°C,10 秒 / 60°C,10 秒 / 68°C,30 秒 (40 cycles)
使用機器： ABI StepOnePlus™

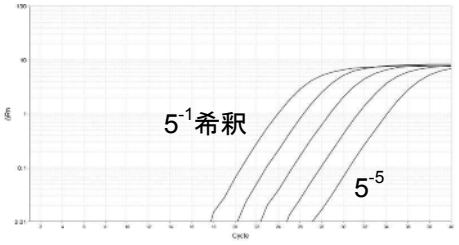
【結果】

弊社品（THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix）では増幅困難であった、GC 含有率が 70%を越えるターゲットにつきましても、本製品では、定量的な増幅が認められました。また、他社製品で認められるようなプライマーダイマーが生じにくいため、低コピーまでの幅広い定量可能域を得ることができました。

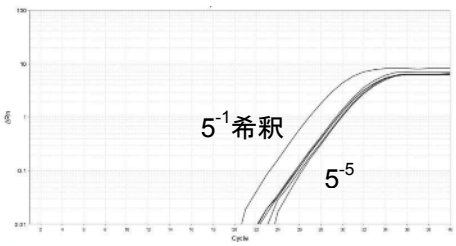
ターゲット：IGF2R 遺伝子 （GC 含有率 83% / cDNA）

KOD SYBR® qPCR Mix	A社製リアルタイムPCR試薬（GC含有率70%以上対応）	弊社品 THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix

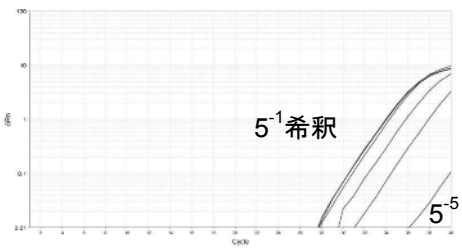
増幅曲線解析



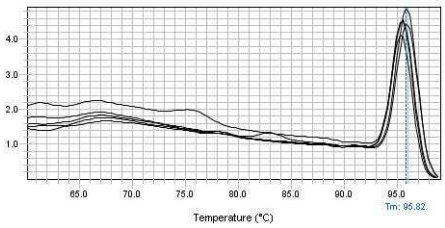
増幅曲線解析



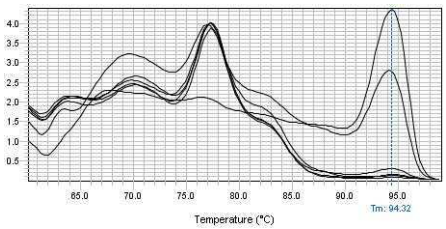
増幅曲線解析



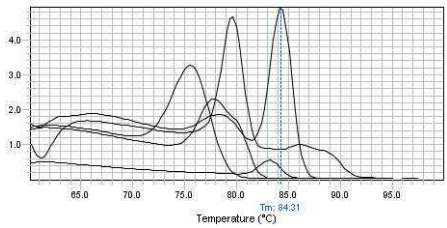
融解曲線解析



融解曲線解析



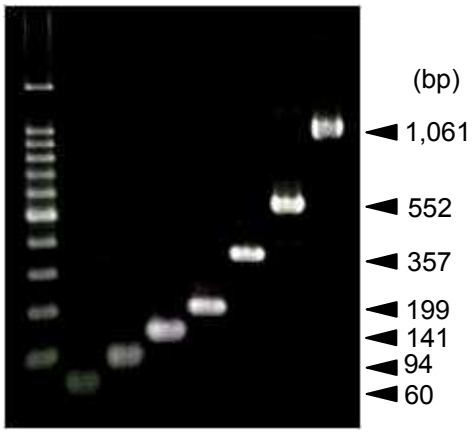
融解曲線解析



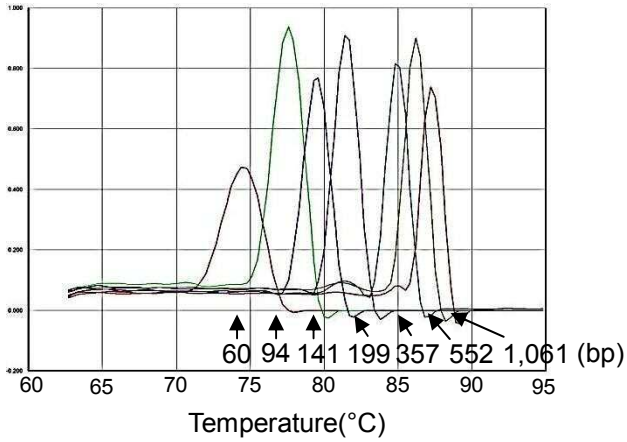
[6] 使用例(Ⅱ) 融解曲線による増幅長多型解析

KOD SYBR® qPCR Mix は約 2kb までの様々なターゲット長を選択することができるため、下図のように増幅長によって増幅産物の Tm 値に差を生じさせることができます。そのため、計算上、Tm 値*1 に差が生じる領域で複数のプライマーを設計することで、ワンチューブ反応でマルチプレックス PCR や増幅長多型解析などを行うことができます。このマルチプレックス PCR におけるピークの識別は、3°C 以上(機器によっては 5°C 以上)の Tm 値の差があれば解析可能です。

(A)電気泳動解析



(B)融解曲線解析



(C)増幅長と予測及び実測 Tm 値

増幅長 (bp)	予測 Tm 値*1 (°C)	実測 Tm 値*2 (°C)
60	72	74
94	76	77.5
141	79	79
199	82	82
357	84	85
552	86	86
1,061	88	87

KOD SYBR® qPCR Mix を用い、ヒト β-actin 遺伝子を様々なプライマーで増幅しました。
(A)増幅後、電気泳動解析を行いました。
(B)増幅後、融解曲線解析を行い、Tm 値の実測値を求めました。
(C)増幅産物の実測 Tm 値と、予測した Tm 値の比較を行いました。

*1:増幅産物の Tm 値は以下の式で概算しております。

$$Tm = 64.9 + 41 \times (yG+zC-16.4) / (wA+xT+yG+zG)$$

※w、x、y、z は、増幅産物中の A、T、G、C の各塩基数

Wallace RB *et al*. (1979) *Nucleic Acids Res* 6:3543-3557
Sambrook,J., and Russell,D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*

弊社では、上記方法に基づく Tm 値計算プログラムを公開しています。弊社のライフサイエンス事業部のウェブページ(http://www.toyobo.co.jp/bio) からダウンロードしてご利用いただけます。

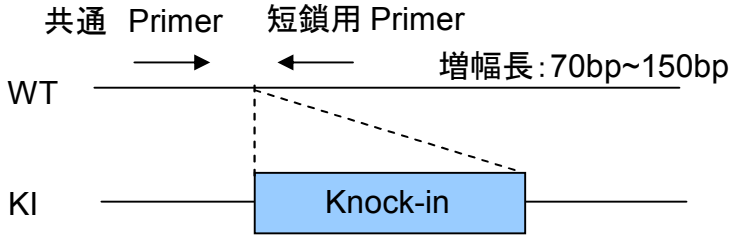
*2:予測 Tm 値と実測 Tm 値が一致しない場合もあります。

次に応用例として、増幅長多型を利用するノックインマウスなどにおけるジェノタイピング用プライマーの設計方法を示します。この方法では、2 つの増幅産物の Tm 値に差が生じるようにターゲット長を調整することで、マルチプレックス PCR が可能となります。

【ジェノタイピング用プライマーの設計方法（片方を共通プライマーとして設計する方法）】

① 短鎖ターゲットの設定

プライマーダイマーと区別するために、増幅産物が 70bp~150bp になるようにプライマーを設計してください。下図では、Wild type（WT）を短鎖側とする例を示していますが、Knock-in（KI）を短鎖側にしても構いません。

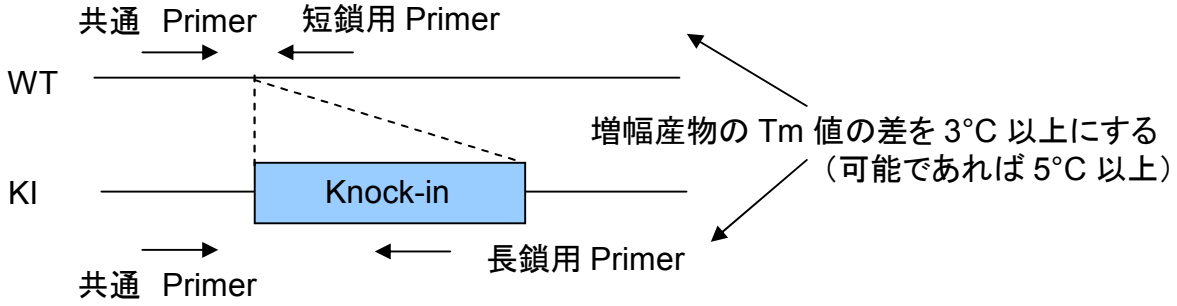


② 短鎖増幅産物の Tm 値の計算

増幅長が 70bp~150bp である短鎖増幅産物の Tm 値の計算を行います（P.15 参照）。

③ 長鎖ターゲットの設定

長鎖ターゲットの増幅産物の Tm 値が①で設計した短鎖増幅産物より 3°C 以上（可能であれば 5°C 以上が望ましい）高くなるように設計します。増幅効率のバランスを考慮し、増幅長を 500bp 以下（300bp 前後が望ましい）になるように設計します。この時、Tm 値の差が 3°C 以上になるように設計できない場合は、短鎖ターゲットの増幅長をさらに短くしてください。



④ 実際に設計したプライマーを用いた予備実験

ここで特に問題になるのがヘテロ体の検出です。SYBR® Green I アッセイでは、シグナル強度が増幅産物のモル数ではなく、増幅産物の量（鎖長）に比例します。よって、以下のような計算式に従って PCR 時のプライマーの量比を決定してください。

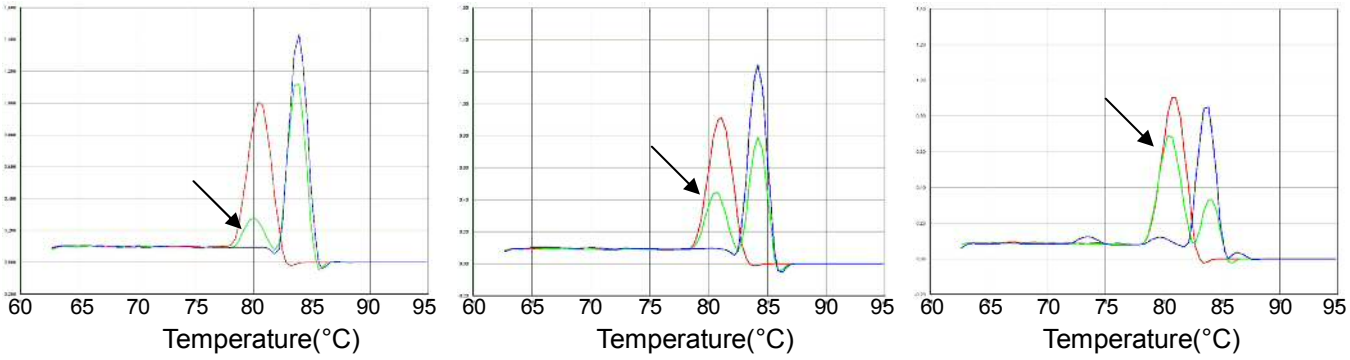
＜プライマー濃度設定＞

	プライマー濃度（μM）
長鎖用プライマー	0.2μM×（短鎖増幅産物長[bp] ÷ 長鎖増幅産物長[bp]）
共通プライマー、短鎖用プライマー	0.2μM

⑤ ピークバランスの修正

融解曲線解析を実施し、ピークの高さを比較します。ピークのバランスが著しく異なる場合は、ピークが高い方のターゲットを増幅するプライマーの濃度を下げる方向で検討を行います。次の図では、共通プライマーと短鎖用プライマー濃度を固定し、長鎖用プライマー濃度を変化させた場合の例を示しています。長鎖用プライマー濃度を低くすることで、短鎖ターゲットのピークが高くなり、長鎖用プライマー濃度を高くすることで、短鎖ターゲットのピークを低くすることができます。

共通:短鎖:長鎖=3:3:1.5(モル比)　共通:短鎖:長鎖=3:3:1　共通:短鎖:長鎖=3:3:0.75



短鎖のピークを低くする　　短鎖のピークを高くする

(※短鎖ターゲット:100bp, 長鎖ターゲット:341bp で検討しました)

実験例 3: マウステールライセートを用いるジェノタイピング

【方法】

上記の方法にて 2 つの増幅産物の Tm 値に差が生じるようにプライマーを設計し、ワンチューブでマウステールライセート(アルカリ熱抽出液)から、直接、ジェノタイピングを実施しました。本実験では、100bp(予測 Tm 値: 79°C)、341bp(予測 Tm 値: 84°C)の増幅産物が生じるようにプライマーを設計しました。

マウステール(3mm 程度)
↓←50mM NaOH 180µl 添加
↓Vortex にて良く攪拌
↓95°C、10 分インキュベート
↓←1M Tris-HCl(pH8.0) 20µl で中和
↓Vortex にて良く攪拌
↓遠心 12,000rpm、5 分(optional)
20µl 反応系に上清 0.5µl～2µl を添加

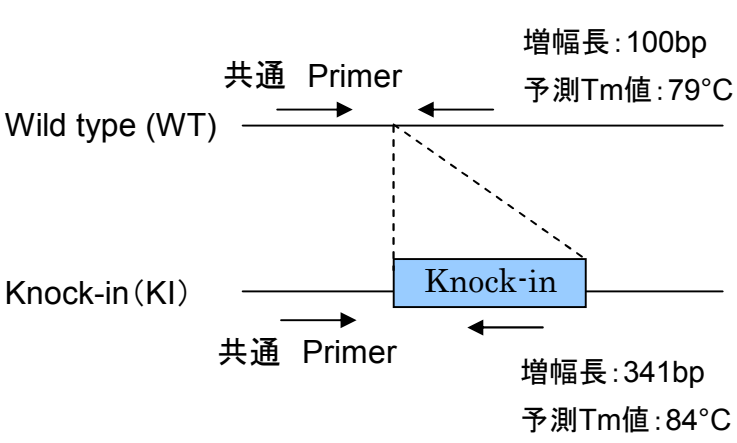
PCR 反応サイクル
98°C、2 分
↓
98°C、10 秒 / 60°C、10 秒 / 68°C、30 秒
(40 cycles*1)

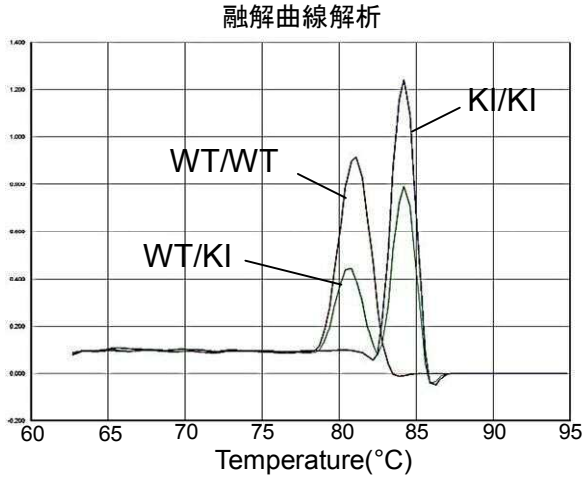
使用機器
ABI 7500 Fast Real Time System

*1:プライマーダイマー発生のリスクを抑えるため、阻害のかからない最大濃度のサンプルを用い、増幅がプラトーに達するのに必要な最低限のサイクル数に設定することをお勧めします。

【結果】

上記のフローに従い、プライマー設計、プライマー比の検討を行った結果、Reverse 側のプライマー比を長鎖:短鎖＝1:3 にすることで、良好な解析を行うことができました。





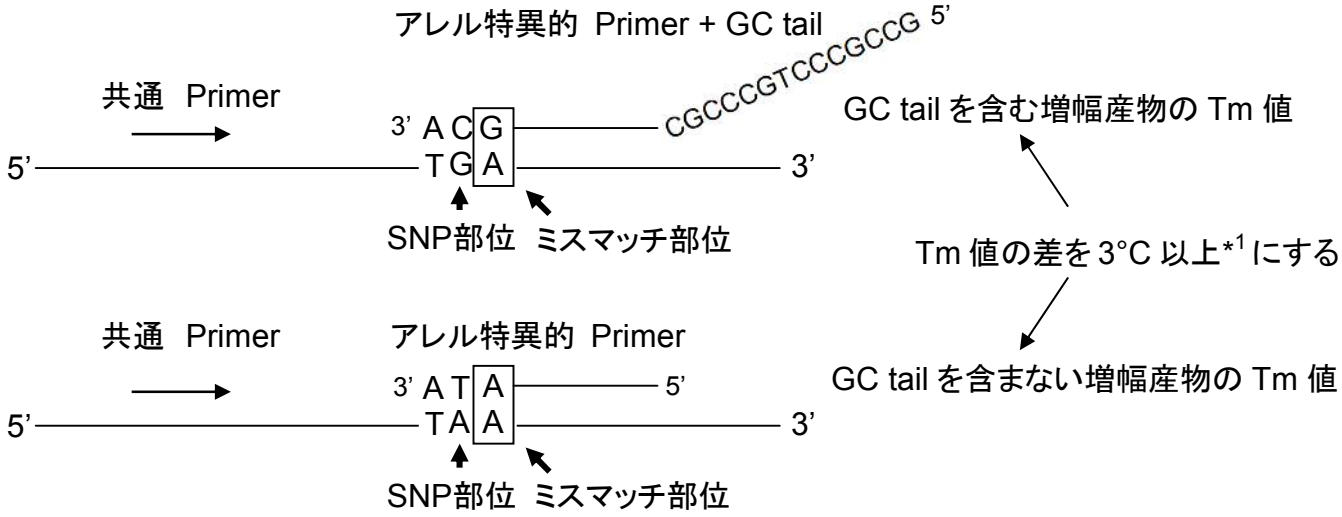
[7] 使用例（Ⅲ） ASP-PCR による SNP 解析

増幅ターゲット長は同一でも、特定のプライマーの 5'側に GC 含量の高いテール配列（GC テール）を付加することによって、特定の増幅産物の Tm 値を 3~5°C ほど高くすることができます。この方法を用いることによって、ワンチューブで ASP(Allele specific primer)-PCR 法を用いる SNP(Single-nucleotide polymorphism)の解析を行うことが可能です。ASP-PCR の方法は GC テールを付加する以外は通常の ASP-PCR と同様です。3'末端（付近）が SNP 部位になるようにプライマーを設計することで、増幅の有無を指標として解析を行うことができます。

【GC tail プライマーの設計方法】

- GC tail による Tm 値上昇の効果を出しやすくするため、増幅長を 100bp 以下に設計します。
- 様々な原理の ASP-PCR に応用可能です。実験例 4（下記の例）では、3'末端から 2 塩基目に SNP 部位、3 塩基目にミスマッチ部位となるように設計しています。3 塩基目のミスマッチは、A に相補する T 以外の塩基であれば、どの塩基を選択しても問題ありませんが、下記の例では、それぞれ G と A としています。
- 設計後、2 つの増幅産物の Tm 値が 3°C 以上*1 になっていることを確認してください。3°C 未満の場合は、増幅長を短くしてください。
- GC tail は下図を参考に付加してください。Tm 値に差が生じる範囲で、GC tail の長さを変えることができます。様々な GC tail が報告されていますので、論文等をご参照ください。
- 増幅後、ピークのバランスが悪い場合は、**【ジェノタイピング用プライマーの設計方法】**(P.16)を参考に、プライマー比の検討を行ってください。

【SNP 検出のためのプライマー設計例】



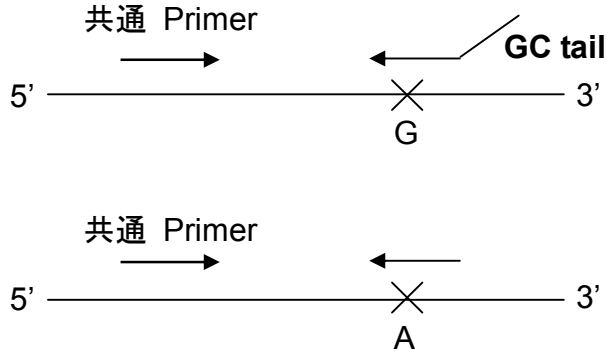
*1: 機種によっては、スムージング機能により、近接する 2 本のピークが幅広い 1 本のピークとして表示される場合があります。この場合、Tm 値の差が 5°C 以上になるようにプライマーを設計してください。Tm 値の差を 5°C 以上に設定するために、増幅長を短く（50bp～60bp 程度）設計することをお勧めします。

実験例 4:血液や口腔粘膜からの検出　～ALDH2 SNP の検出～

【方法】

血液や口腔粘膜から DNA の精製なしに、ワンチューブ反応における ALDH2（アルデヒドデヒドロゲナーゼ 2）SNP の検出を行いました。

SNP 検出の場合、増幅ターゲット長が同じになるため、片方のアレル特異的プライマーに GC tail を付加することで、増幅産物の Tm 値に差が生じるように設計しました。



ALDH2 SNP 部位の配列

Allele	Sequence
487Glu	5'-ctgcaggcatacact GAA gtgaaaactgtga-3'
487Lys	5'-ctgcaggcatacact AAA gtgaaaactgtga-3'

Primer	Sequence	増幅長	予測 Tm 値
共通プライマー	5'-GTACGGGCTGCAGGCATAC-3'	ー	ー
G 特異的プライマー	5'-GCCGCCCTGCCCGCCACACTCACAGTTTTCACTGCA-3'	57bp	78°C
A 特異的プライマー	5'-CCCACACTCACAGTTTTCACTATA-3'	45bp	72°C

※下線:GC tail、C or T:SNP 部位、G or A :ミスマッチ部位

テンプレートは、下記に示す通りに調製し、反応液に直接添加しました。

PCR サイクル条件: 98°C,2 分 → 98°C,10 秒 / 60°C,10 秒 / 68°C,30 秒 (50 cycles)

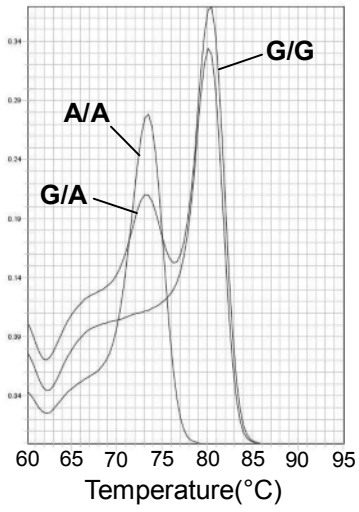
【結果】

ゲノム DNA の精製を行うことなく、遺伝子型の識別が可能でした。

血液

血液 2μl
↓
48μlの滅菌水で希釈
↓
20μl反応系に5μl添加

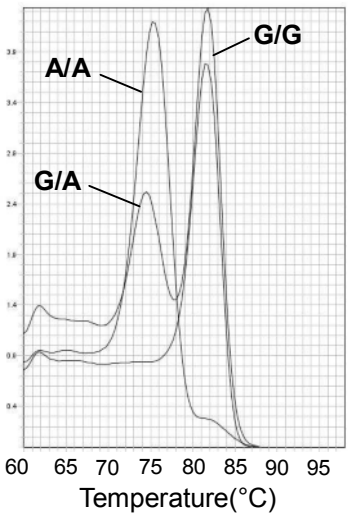
融解曲線解析



口腔粘膜

綿棒により口腔粘膜を採取
↓
200μlの滅菌水で懸濁
↓
20μl反応系に5μl添加

融解曲線解析



[8] 関連プロトコル:RNA サンプルからの cDNA 合成

本試薬は、さまざまな逆転写反応用試薬を用いて合成した cDNA を鋳型として用いることが可能です。リアルタイム PCR 用に設計された逆転写反応用試薬を用いることで、より感度の高い反応を行うことが可能となります。

弊社 ReverTra Ace® qPCR RT Kit (Code : FSQ-101)、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix(Code : FSQ-201)、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(Code : FSQ-301)はリアルタイム PCR での使用を考慮して設計された、高効率 cDNA 合成キットです。本製品と組み合わせることで、より信頼性の高い結果を得ることができます。ここでは、ReverTra Ace® qPCR RT Kit を用いたリアルタイム PCR 用 cDNA 合成法について記載します (詳細はキットに添付の取扱説明書をご参照ください)。

●ReverTra Ace® qPCR RT Kit (Code: FSQ-101)

(1)RNA の変性(オプション)

鋳型として用いる RNA 液を使用量分取し、65°C で 5 分間インキュベートした後、氷上で急冷します。

・この処理はスキップすることも可能ですが、この処理を行うことで、高次構造を取りやすい RNA に対する逆転写効率が向上する場合があります。
・この処理を行う際は、5×RT Buffer や RT Enzyme Mix は添加しないでください。RNA の分解や酵素活性の低下の原因となります。

(2)反応液の調製

氷上にて、以下のように反応液を調製します。

Nuclease-free Water	X µl
5×RT Buffer	2 µl
RT Enzyme Mix	0.5 µl
Primer Mix	0.5 µl
RNA	0.5pg～1µg 相当
Total volume	10 µl

(3)逆転写反応

反応液を軽く攪拌して均一にした後、以下の温度でインキュベートします。

37°C, 15 分 ・・・・・・・・・・・・ (逆転写反応)
98°C, 5 分 ・・・・・・・・・・・・ (酵素失活反応)
4°C, hold

反応終了後は、4°C または-20°C で保存します。リアルタイム PCR 実施の際は、鋳型として反応液に直接または希釈して添加してください。

[9] トラブルシューティング

現象	原因	対策
高濃度サンプルの反応で直線性が乱れる	サンプル DNA への SYBR® Green I の結合によるベースラインの上昇	SYBR® Green I は全ての二本鎖 DNA に結合し、蛍光を発する性質を持つため、サンプルに高濃度の二本鎖 DNA が含まれる場合、ベースラインが上昇し、正確な Ct 値を算出できなくなることがあります。サンプル濃度を下げて反応を行ってください。
	サンプル溶液中の不純物による反応阻害	サンプル中に多くの不純物を含む場合、PCR が阻害されることがあります。また、リアルタイム PCR 用に設計されていない逆転写反応用試薬により合成した cDNA をご使用の場合、逆転写反応液に含まれる物質によって、反応が阻害されることがあります。サンプル濃度を下げて反応を行うか、サンプルの精製を行ってください。また、逆転写反応にはリアルタイム PCR 用に設計された試薬を用いてください。
低濃度サンプルの反応で直線性が乱れる	標的 DNA のコピー数が少なすぎる	反応液中に標的 DNA が数コピーから数十コピーしか含まれない場合、確率的にコピー数のばらつきが大きくなり、直線性が乱れやすくなります。サンプル濃度を上げて反応を行ってください。
	DNA の反応チューブへの吸着	使用したサンプルの DNA 量が少ない場合、またはサンプルを希釈して長時間放置した場合、DNA が反応チューブへ吸着するなどの原因で実質的な鋳型量が減少することがあります。サンプル濃度を上げて反応を行ってください。また、サンプルを希釈して反応を行う場合は、希釈は反応直前に行ってください。
	プライマーダイマーの同時発生	標的 DNA の増幅と、プライマーダイマーの増幅とが同時に発生し、標的配列のみの増幅曲線が検出できなくなることがあります。融解曲線解析によって複数のピークが確認される場合は、反応条件の再検討を行い、プライマーダイマーの発生を回避してください。鋳型量を阻害のかからない最大量にし、サイクル数を少なくすることでエンドポイントアッセイでは問題を回避できる場合があります。
希釈系列サンプルの増幅曲線の間隔が揃わない	非特異反応との競合	プライマーの特異性が十分でない場合、標的以外の増幅反応が同時発生し、標的配列のみの増幅曲線が検出できなくなることがあります。融解曲線解析によって複数のピークが確認される場合は、反応条件の再検討を行い、非特異反応の発生を回避してください。改善されない場合は、プライマー配列の変更を検討してください。
	プラスミドを鋳型としている場合	鋳型として環状プラスミドを使用している場合、ばらつきが生じやすくなります。制限酵素で切断し、直鎖状にしたものをご使用ください。

現象	原因	対策
PCR 効率が 80%を下回る (slope < -3.95)	反応条件の不適合	標的配列によっては、標準の反応条件で十分な PCR 効率が得られない場合があります。**[4] 使用方法 (2) PCR サイクル条件設定**に従って、PCR 反応条件の再検討を行ってください。
	プライマーの Tm 値が通常よりも低い (60°C 以下)	Tm 値が低いプライマーを用いた場合、標準のサイクル条件では十分にアニーリングが行われないことがあります。**[4] 使用方法 (2) PCR サイクル条件設定**に従って、アニーリング温度の再検討を行ってください。
	プライマーの劣化	プライマーの劣化により、PCR 効率が大きく低下することがあります。プライマーの原液からの再希釈、またはプライマーの再合成を行ってください。
	PCR 効率算出時に、直線から外れた Ct 値を含めた	直線から外れた Ct 値を PCR 効率算出に利用した場合、算出値の誤差が増大します。直線から外れた Ct 値を算出対象から外し、再計算を行ってください。
	プライマー量が少ない	プライマー量を増やすことで、増幅効率が改善する場合があります。
PCR 効率が 110%を上回る (slope > -3.1)	PCR 効率算出時に、直線から外れた Ct 値を含めた	直線から外れた Ct 値を PCR 効率算出に利用した場合、算出値の誤差が増大します。直線から外れた Ct 値を算出から外し、再計算を行ってください。
	非特異反応の発生	非特異反応の発生により、PCR 効率が 110%を超えることがあります。融解曲線解析により特異性の確認を行ってください。
再現性が悪い	サンプル中に不純物が多い	サンプル中に不純物を多く含む場合、PCR への阻害が発生し、再現性が低下することがあります。サンプル濃度を下げて反応を行うか、サンプルの精製を行ってください。
	希釈後、長時間放置したサンプルを使用	濃度が薄い DNA 溶液は、容器への吸着によって実効濃度が低下することがあります。原液から再希釈を行ってください。また、希釈系列による標準サンプルは、希釈後の保存は避け、毎回反応時に原液から都度作製してください。
	鋳型に精製プラスミド DNA や PCR 増幅産物を使用	精製プラスミド DNA 溶液や PCR 増幅産物を鋳型として使用する場合、希釈して用いることがあります。その際、溶液中の DNA 濃度が極めて低くなることで、DNA が容器への吸着などによって失われやすくなり、特に低濃度域の直線性や再現性が大きく低下する原因となります。希釈の際には、反応と関与しない核酸(yeast RNA など)を希釈液に混合することで低濃度域の直線性が改善される場合があります。
	プライマーの品質差	同一の配列を持つプライマーでも、合成時毎に品質差が発生することがあります。新規に合成を行った際は、従来用いていたものと比較実験を行って、品質差の確認を行ってください。

現象	原因	対策
no-template control (NTC)で増幅が見られる	プライマーダイマーの発生	融解曲線解析において、no-template control のピークが標的配列よりも低温側に存在する場合は、プライマーダイマーの発生が疑われます。プライマーダイマーは、プライマー配列のほか、プライマーの品質によっても発生程度が異なります。まず**[4] 使用方法 (2) PCR サイクル条件設定**に従って、PCR 反応条件の再検討を行い、改善が見られない場合には、プライマーの再設計や再合成を検討してください。また、再合成の際は、精製グレードを HPLC 以上にしてください。
	コンタミネーションの発生	融解曲線解析において、no-template control のピークが標的配列とほぼ同じ位置に存在する場合は、増幅産物のキャリーオーバーが疑われます。再試時も再現する場合には、試薬類や滅菌水へのコンタミネーションが発生している可能性がありますので、試薬類や滅菌水の更新を行ってください。
増幅曲線の蛍光シグナルが弱い、または増幅曲線の形状がギザギザになる	50×ROX reference dye の添加量が過剰	パッシブリファレンスを使用する機器において、50×ROX reference dye の添加量が過剰である場合、蛍光量補正時に SYBR® Green I の蛍光値が低く見積もられることがあります。**[4] 使用方法 (1) 反応液の調製**に従い、50×ROX reference dye の添加量を確認してください。
	蛍光測定時間が短い	一部の機器では、PCR の伸長時間が短すぎる場合、蛍光測定が十分に完了しない場合があります。増幅曲線のがたつきが目立つ場合には、伸長時間を長め(45～60 秒)に設定することで、改善される場合があります。
	反応液量が少ない	機器の標準条件よりも少ない液量で反応を行った場合、蛍光測定値の誤差が増大する傾向があります。液量を増やして反応を行ってください。
融解曲線解析で複数のピークが見られる	非特異反応の発生	プライマーの特異性が十分でない場合、標的以外の増幅反応が同時発生し、純粋な標的配列のみの増幅曲線が検出できなくなることがあります。反応条件の再検討を行い、非特異反応の発生を回避してください。改善されない場合は、プライマー配列の変更を検討してください。
	プライマーダイマーの発生	標的 DNA の増幅と、プライマーダイマーの増幅とが同時に発生することがあります。反応条件の再検討を行い、プライマーダイマーの発生を回避してください。改善されない場合は、プライマー配列の変更や、精製グレードを上げた再合成を検討してください。

現象	原因	対策
プライマーに GC tail を付加したが、Tm 値に差が認められない	増幅長が長い	増幅長が長い場合、GC tail が Tm 値に与える影響が小さくなります。増幅長を 100bp 以下になるようにプライマーを設計してください。なお、増幅産物の Tm 値を計算上求めることで、Tm 値の差を推測することができます。
	増幅産物の GC 含有率が高い	増幅産物の GC 含有率が高い場合、GC tail を付加しない状態でも Tm 値が著しく高くなります。そのため、GC tail が Tm 値に与える影響が小さくなります。この場合は、別の領域にプライマーを設計してください。
マルチプレックス検出において、Tm 値が分かれない	増幅長が長い	増幅産物の Tm 値は、増幅長が短い範囲では、増幅長に比例し Tm 値が上昇しますが、ある一定以上の長さになると、Tm 値が一定になります。計算上、増幅産物の Tm 値を求め、差が生じる増幅長の範囲でプライマーを再設計してください。
	増幅産物の GC 含有率が高い	増幅産物の GC 含有率が高い場合、短鎖ターゲットにおいても、Tm 値が高くなるため、Tm 値に差が生じにくくなります。短鎖の範囲内で計算上、Tm 値に差が生じるようにプライマーを設計してください。Tm 値が変わらない場合は、別の領域での設計を検討してください。
	スムージング機能による影響	機種によっては、スムージング機能により、近接する 2 つのピークを幅広い一本のピークとして表示する場合があります。この場合、融解曲線サイクルの温度上昇速度を下げて融解曲線解析を行うことで、解決できる場合があります。改善されない場合は、Tm 値の差が 5°C 以上になるようにプライマーを再設計してください。
マルチプレックス検出において、ピークのバランスが悪い	2 種類のターゲットで増幅長が著しく異なる	SYBR® Green I アッセイでは、増幅長に比例し、蛍光強度が強くなります。そのため、増幅長が著しく異なる場合は、増幅量が同じでもピークの高さが異なります。ターゲット長に大きな差が生じないようにプライマーを設計し直してください。また、ピークが高いターゲットを増幅するプライマー量を減らすことで改善することがあります。
	アニーリング効率が異なる	2 種類のプライマーの Tm 値が大きく異なる場合、アニーリング効率が異なるため、増幅量のバランスが悪くなります。まず、ピークが高い方のプライマー量を減らす検討を行ってください。改善されない場合は、2 種類のプライマーの Tm 値が同じになるようにプライマーを再設計してください。

[10] 関連商品

高効率 SYBR® Green I 検出系用リアルタイム PCR 試薬

品名	容量	Code No.
SYBR® Green I 検出系用リアルタイム PCR 試薬 **THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix**	1ml×1 (40 回用)	QPS-201T
	1.67ml×3 (200 回用)	QPS-201

※THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix では、50×ROX reference dye が別容器で添付されます。
※容量は、50µl 反応の場合の反応回数です。
※1000 回用の QPS-201×5 (QPS-201 の 5 セット組) もご用意しています。

各種蛍光プローブ・蛍光プライマー検出系用リアルタイム PCR 試薬

品名	容量	Code No.
各種蛍光プローブ・蛍光プライマー検出系用 リアルタイム PCR 試薬 **THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix**	1ml×1 (40 回用)	QPS-101T
	1.67ml×3 (200 回用)	QPS-101

※THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix では、50×ROX reference dye が別容器で添付されます。
※容量は、50µl 反応の場合の反応回数です。
※1000 回用の QPS-101×5 (QPS-101 の 5 セット組) もご用意しています。

cDNA 合成試薬

品名	容量	Code No.
リアルタイム PCR 用 cDNA 合成キット **ReverTra Ace® qPCR RT Kit**	200 回用	FSQ-101
リアルタイム PCR 用 cDNA 合成キット 完全プレミックスタイプ **ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix**	200 回用	FSQ-201
リアルタイム PCR 用 cDNA 合成キット 完全プレミックスタイプ（ゲノム DNA 除去試薬付き） **ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover**	200 回用	FSQ-301

※容量は、10µl 反応の場合の反応回数です。

より詳細な情報は、弊社ウェブサイトをご覧ください

◆東洋紡ライフサイエンス事業部ウェブサイト◆

http://www.toyobo.co.jp/bio

【製造・販売元】

－納期・注文に関するお問い合わせ－

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部　(大阪)
〒530-8230　大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号
TEL 06-6348-3786　FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部　(東京)
〒141-8633　東京都品川区東五反田二丁目 10 番 2 号　東五反田スクエア
TEL 03-6422-4819　FAX 03-6422-4951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

－製品の内容・技術に関するお問い合わせ－

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　FAX 06-6348-3833
開設時間　9:00～12:00 , 13:00～17:00　(土、日、祝を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
［URL］http://www.toyobo.co.jp/bio